ORSAY

Série A

N°d'ordre 993

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

-CENTRE D'ORSAY-

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Régis CALVAYRAC

Sujet de la thèse :

Le cycle des mitochondries chez *Euglena gracilis* en cultures synchrones

Soutenue le 30 juin 1972

Membres du jury : MM P. SLONIMSKI — Président
C. LIORET
J. ANDRE — Examinateurs
Mme M. LEFORT-TRAN

Article : L'influence de substrats carbonés et du lactate en particulier sur la synchronisation des cellules et l'induction des grandes mitochondries chez *Euglena gracilis Z*

L'influence de substrats carbonés et du lactate en particulier sur la synchronisation des cellules et l'induction des grandes mitochondries chez Euglena gracilis Z.

par R. CALVAYRAC et Mme M. LEFORT-TRAN

Résumé. — *Euglena gracilis* Z, hétérotrophe à l'obscurité, peut utiliser diverses sources de carbone. Le lactate s'est révélé excellent pour le rendement cellulaire; il permet en outre de synchroniser les cellules sur un cycle de 12 heures. L'analyse structurale des euglènes synchrones révèle l'existence d'un cycle mitochondrial confirmé par la mise en évidence de la replication cyclique et discontinue de l'ADN mitochondrial.

Summary. — *Euglena gracilis* Z, heterotrophic in the dark, may use various carbon sources. The lactate is a good substrate for the cells growth, and it is easy to synchronize the cells with twelve hours cycles.

Structural analysis of the synchroneous Euglena reveal the existence of a mitochondrial cycle. The demonstration of a cyclic and discontinuous DNA mitochondrial replication, confirm this cycle.

INTRODUCTION

Si l'euglène peut croître à la lumière sur milieu minéral en autotrophie, sa croissance hétérotrophique à l'obscurité requiert la présence d'un substrat carboné comme source d'énergie.

Les intermédiaires du cycle de Krebs sont les composés les plus généralement employés (Hutner et Provasoli, 1951, 1955 ; Danforth, 1953). Le milieu synthétique le plus couramment utilisé est celui mis au point par Greenblatt et Schiff (1959) et dans la composition duquel entrent du glutamate et du malate. C'est celui que nous prendrons comme milieu de référence.

Le glucose (Cramer et Myers, 1952 ; Pringsheim, 1955 ; Hutner *et al*, 1956 ; Belsky, 1957 ; Danforth, 1962 ; Hurlbert et Rittenberg, 1962), l'acétate et l'éthanol sont aussi des substrats carbonés favorables à la croissance (Hutner et Provasoli, 1951, 1955; Cramer et Myers, 1952; Danforth et Wilson, 1957; Wilson et Danforth, 1958). Le butyrate (Cramer et Myers, 1952, De Deken, 1960) et le lactate (Calvayrac et Douce, 1970) peuvent également être employés comme source de carbone pour la croissance hétérotrophique de l'euglène.

Le milieu avec lactate que nous avons mis au point possède comme celui contenant du glutamate et du malate, un pH acide. Il permet en outre de synchroniser les euglènes selon un cycle de douze heures indépendamment de la lumière et de la température, contrairement aux techniques habituelles de synchronisation (Cook et James, 1960; Edmunds, 1964; Padilla et James, 1960; Pogo et Arce, 1964; Mitchell, 1971).

La présence du lactate dans le milieu permet d'observer à certaines phases du cycle cellulaire, des mitochondries géantes en réseau qui rappellent celles qui peuvent être induites par l'acétate (Lefort. 1964). Ces modifications morphologiques cycliques du chondriome se

retrouvent à la lumière comme à l'obscurité et sont liées à la replication de l'ADN mitochondrial donc à la division des mitochondries.

MATERIEL ET TECHNIQUES

A) Cultures

Euglena gracilis lignée Z, est cultivée à l'obscurité à 27° C sur un milieu minéral (Greenblatt et Schiff, 1959) et (Calvayrac et Douce, 1970) tamponné à pH 3,5 auquel sont ajoutées de la thiamine (vitamine B1) et de la cyanocobalamine (vitamine B12). Ce milieu synthétique de base est complété par une source de carbone qui peut être soit de l'acide L glutamique (14 mM) et de l'acide DL malique (15 mM), soit de l'acide DL lactique (33 mM).

Pour les cultures synchrones sur milieu lactate, à partir d'une culture maintenue en phase plateau depuis 5 ou 6 jours, une partie aliquote est repiquée sur milieu lactate frais. Les divisions cellulaires synchrones des euglènes sont déclanchées et maintenues par dilution ou repiquage lorsque la densité cellulaire atteint 10^6 cellules/ml.

La croissance de la population cellulaire et les divisions synchrones sont suivies par comptage à l'hématimètre.

B) Mesures physiologiques

La respiration cellulaire est mesurée, sur cellules entières, par polarographie à l'aide d'une électrode à membrane (type Clark *et al.*, 1953) et est exprimée en µl d'oxygène consommé par heure et pour 10^6 euglènes (µl- 0^2/H/10^6 Eg).

Le marquage des acides desoxyribonucléiques cytoplasmiques et nucléaires se fait à l'aide d'adénine ^{3}H et à la concentration finale de 10µ Ci/ml. Une partie aliquote d'un prélèvement cellulaire à une densité voisine de 7 10^7 euglènes, est placée dans 20 ml de milieu et mise à incuber 2 h. 30 à l'obscurité à 28 C° en présence du précurseur radioactif.

Les cellules sont, après le marquage, lavées au SSC 0,1. L'extraction et l'analyse des ADN sont faites selon L. Grossman (1969) avec certaines modifications pour l'adapter à notre matériel. La radioactivité du précurseur incorporé dans l'ADN est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation.

C) Cytologie

Pour les observations en microscopie électronique, les euglènes sont préfixées par la glutaraldéhyde à 2 %, directement dans le milieu de culture pendant 10 minutes, puis après centrifugation elles sont remises dans une solution fraîche de glutaraldéhyde à 4 % dans le tampon phosphate pH 7 pendant une heure. Une post fixation au tétroxyde d'osmium est assurée par une solution à 1 % dans le tampon phosphate pH 7, pendant une heure à 2 °C. Les cellules sont ensuite deshydratées, infiltrées et incluses dans l'Epon.

RÉSULTATS

pH.

On remarque (courbe 1) que sur nos milieux (GM) et (L) pendant toute la phase exponentielle de croissance où le temps de génération est de 12 h., le pH ne varie pas. Dès la phase de transition, les valeurs du pH augmentent pour se stabiliser autour de la neutralité dans le milieu (GM) et entre les valeurs 5 et 6 pour le mlieu lactate lorsque la phase stationnaire est atteinte.

UNIV. LEIDEN BIBL.

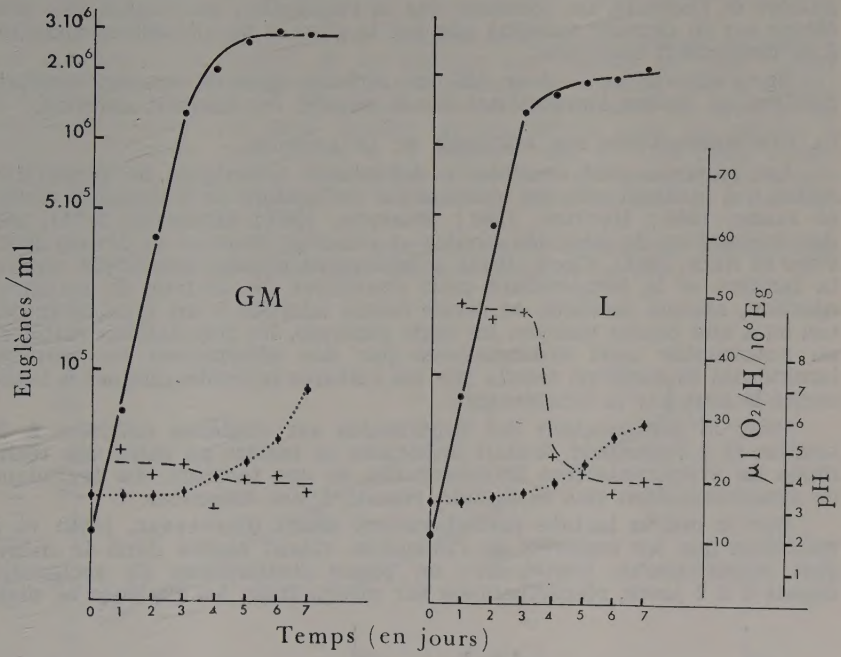

Fig. 1. — GM - Courbe de croissance des euglènes sur milieu glutamate-malate (courbe en trait fort ——— ● ———).

— La courbe de la respiration cellulaire (— — × — —) est exprimée en µ litre d'oxygène par heure et pour 10^6 euglènes (µl 0_2/H/10^6 Eg).

— La courbe en pointillé (... ∅ ...) représente les variations du pH du milieu en fonction de l'âge de la culture.

Le pH du milieu, outre son rôle bactéricide lorsqu'il est acide joue un rôle important dans l'assimilation des substances carbonées par voie de conséquence sur le temps de génération cellulaire.

En règle générale, les euglènes ont un temps de génération minimum sur les milieux à pH acide, qui augmente avec l'élévation du pH. D'après Cook et Heinrich (1965), les euglènes sur milieu glucose dont le pH oscille entre 3 et 5 ont un temps de génération de 11 h. 30 qui double lorsque le pH atteint la normalité. Le taux de respiration endogène, mesuré sur des euglènes lavées et remises sur milieu minéral, n'excède pas 20± 5 µl 0^2/H/10^6 Eg.

En nous reportant à la figure 1, nous pouvons constater que la respiration sur le milieu (GM), reste à peu près constante durant un cycle cellulaire de 12 h. et voisine de 20 ± 6 µl 0^2/H/10^6 Eg, donc égal à celui de la respiration endogène. Sur le milieu (L) le taux respiratoire atteint 46 ∓ 7 µl 0^2/H/10^6 Eg et représente donc plus du double de la respiration endogène. Si on compare, pour un même milieu (même substrat carboné) les valeurs du taux respiratoire en fonction d'une gamme de pH de 3 à 9, on constate qu'ils restent pratiquement inchangés. Au contraire si on compare les taux respiratoires

pour deux milieux dont les sources carbonées sont respectivement le glucose et l'acétate, on constate que la respiration est quatre fois plus élevée sur ce dernier substrat que sur le glucose où elle est comparable à la respiration endogène.

Sans enlever au facteur pH une certaine importance, ces résultats mettent en valeur l'importance de la qualité du substrat carboné.

LA SYNCHRONISATION DES EUGLÈNES ET LE LACTATE.

Les euglènes sont sensibles à différentes techniques de synchronisation qui utilisent soit des alternances de lumière et d'obscurité (COOK et JAMES, 1960 ; HULTING, 1960 ; EDMUNDS, 1964 ; MITCHELL, 1971), soit des successions de périodes froides et chaudes (PADILLA et JAMES, 1960; POGO et ARCE, 1964). COOK (1971) a également montré que le pH comme la lumière et la température peut constituer un facteur de synchronisation, chaque méthode se révèle mieux adaptée à un type de matériel ou à une espèce donnée. En règle générale, les populations cultivées en autotrophie sont synchronisées par des alternances de périodes lumineuses et sombres, tandis que les cultures hétérotrophiques à l'obscurité le sont par la température.

Pour la comparaison des expériences sur euglènes cultivées à la lumière et à l'obscurité, il était important de mettre au point une technique de synchronisation indépendante de ces facteurs. La technique de synchronisation pas le lactate répond à ces exigences.

Sur le milieu lactate précédemment défini (CALVAYRAC, 1970) et à condition que les euglènes de l'inoculum soient toutes dans le même état physiologique, c'est-à-dire en phase stationnaire de croissance depuis 5 à 7 jours, réensemencées sur milieu frais, les euglènes se divi-

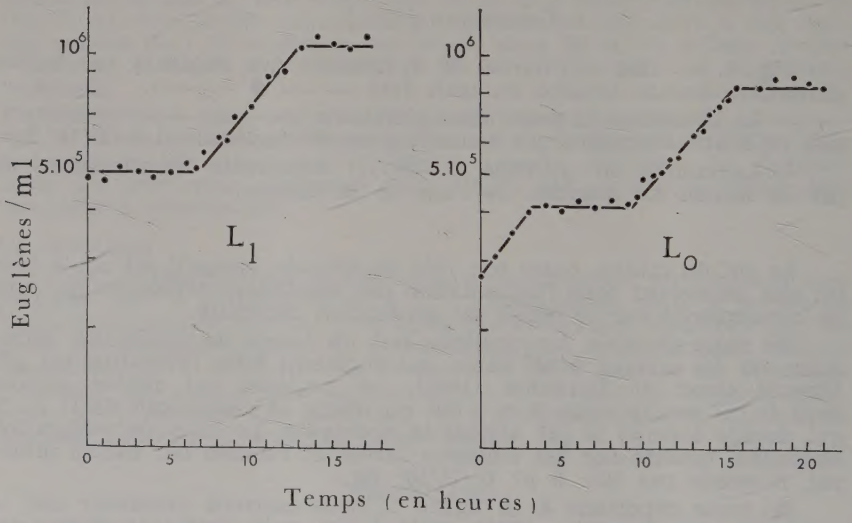

Fig. 2. — Courbe de croissance des euglènes sur milieu lactate au cours d'une génération.

Ll = croissance des euglènes en présence de lumière (alternance de lumière et d'obscurité : 6 h. 6 h).

Lo = croissance des euglènes à l'obscurité continue.

— chaque courbe présente une période de division de 6 h. environ.

sent synchroniquement pendant plusieurs générations. Dans ces conditions, les périodes de non division et de division sont égales à 6 heures ∓ 1 heure (fig.2).

On remarque que le temps de division à la lumière comme à l'obscurité est égal à 12 heures. Si on analyse ces courbes on peut établir que les numérations faites pendant la période de division (partie ascendante de la courbe) se répartissent selon une courbe de Gauss. La transformée probit de cette courbe est une droite pour les cellules à l'obscurité comme pour celles à la lumière (fig. 3). Ces deux transformées probit sont des droites parallèles, ce qui permet d'affirmer que le degré de synchronisation est le même pour les cellules à l'obscurité et celles à la lumière.

Ainsi, dans ce système de synchronisation la lumière n'intervient pas et le facteur inducteur est probablement le lactate.

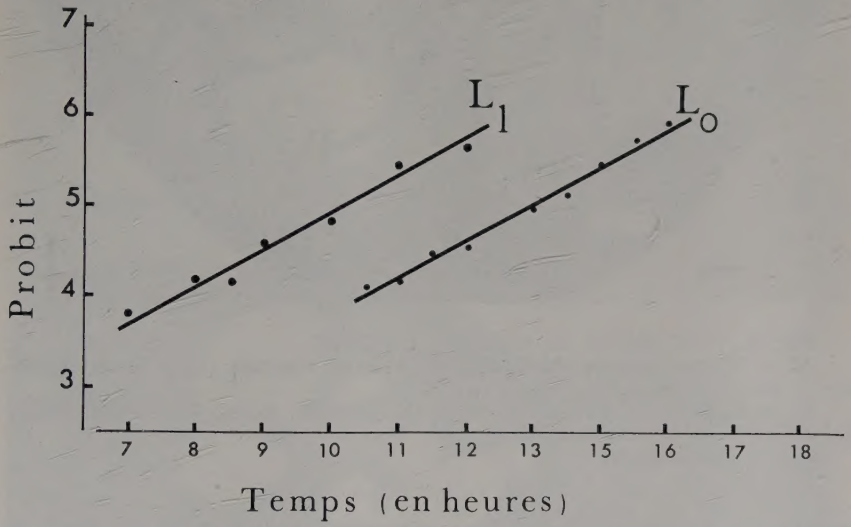

Fig. 3. — Transformées probit de la phase de division des cellules (voir fig. 2) cultivées sur lactate en présence de lumière (Ll) et à l'obscurité (Lo) — les deux droites sont parallèles.

CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES DU CHONDRIOME.

Dans les conditions de cultures synchrones ainsi définies il est possible, en analysant un cycle cellulaire sur des prélèvements horaires, de mettre en évidence des changements morphologiques périodiques des mitochondries chez des euglènes à l'obscurité (figures de 4 à 8). Chaque figure est l'expression moyenne de l'aspect du chondriome recouvrant une période de trois heures (regroupement de 3 prélèvements).

La figure 4 représente une euglène en cours de division, caractérisée par le noyau avec son endosome étiré et le redoublement spécifique des sillons de la pellicule externe. Les mitochondries sont petites (1 à 2 μ) et uniformément réparties dans la cellule. Dès que la division cellulaire est achevée, on note une augmentation du volume des mitochondries La matrice s'éclaircit et les crêtes sont périphériques (fig. 5). Sur des sections cellulaires corticales (fig. 6) les mitochondries apparaissent gonflées et semblent s'anastomoser pour former ultérieu-

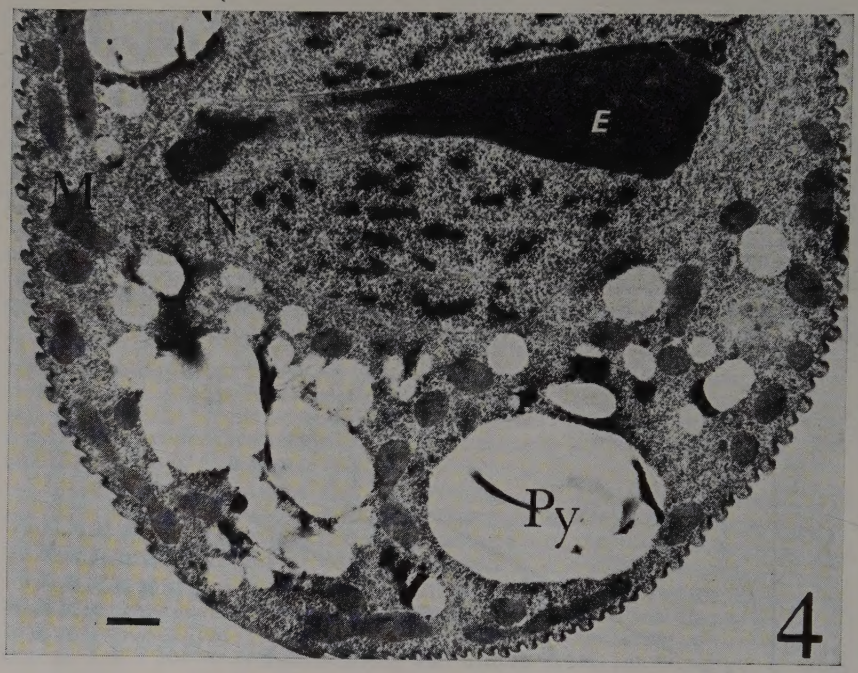

Fig. 4. — Euglènes en division, × 10.000.
M = Mitochondries, bien individualisées, éparses dans le cytoplasme, à matrice dense.
N = Noyau en division — E = Endosome, notez les microtubules qui relient les endosomes fils.
Py = Paramylon.

rement un réseau mitochondrial périphérique (fig. 7 et 8) dont la matrice devient plus dense (fig. 8). Puis le réseau mitochondrial va se fragmenter et une nouvelle division cellulaire interviendra.

Replication des ADN nucléaire et mitochondrial.

On peut, par incorporation d'adénine ^{3}H dans les ADN cellulaires, suivre au cours d'un cycle de 12 heures, les maxima d'incorporation qu'on peut assimiler aux moments préférentiels de synthèse de ces macromolécules.

D'après la figure 9, les tracés de radioactivité traduisant l'incorporation de l'adénine tritiée dans l'ADN total, comprennent toujours un pic majeur qui correspond à l'ADN nucléaire et un pic satellite qui a été caractérisé comme de l'ADN mitochondrial (Calvayrac *et al.*, 1972). On remarque que l'incorporation maximum dans le pic nucléaire a lieu au tout début de la phase de division cellulaire. La courbe en tiretés présente, dans le temps, l'intégration des résultats partiels pour chaque prélèvement.

Le maximum d'incorporation c'est-à-dire le moment de synthèse préférentielle de l'ADN mitochondrial accompagne toujours celui de l'ADN nucléaire.

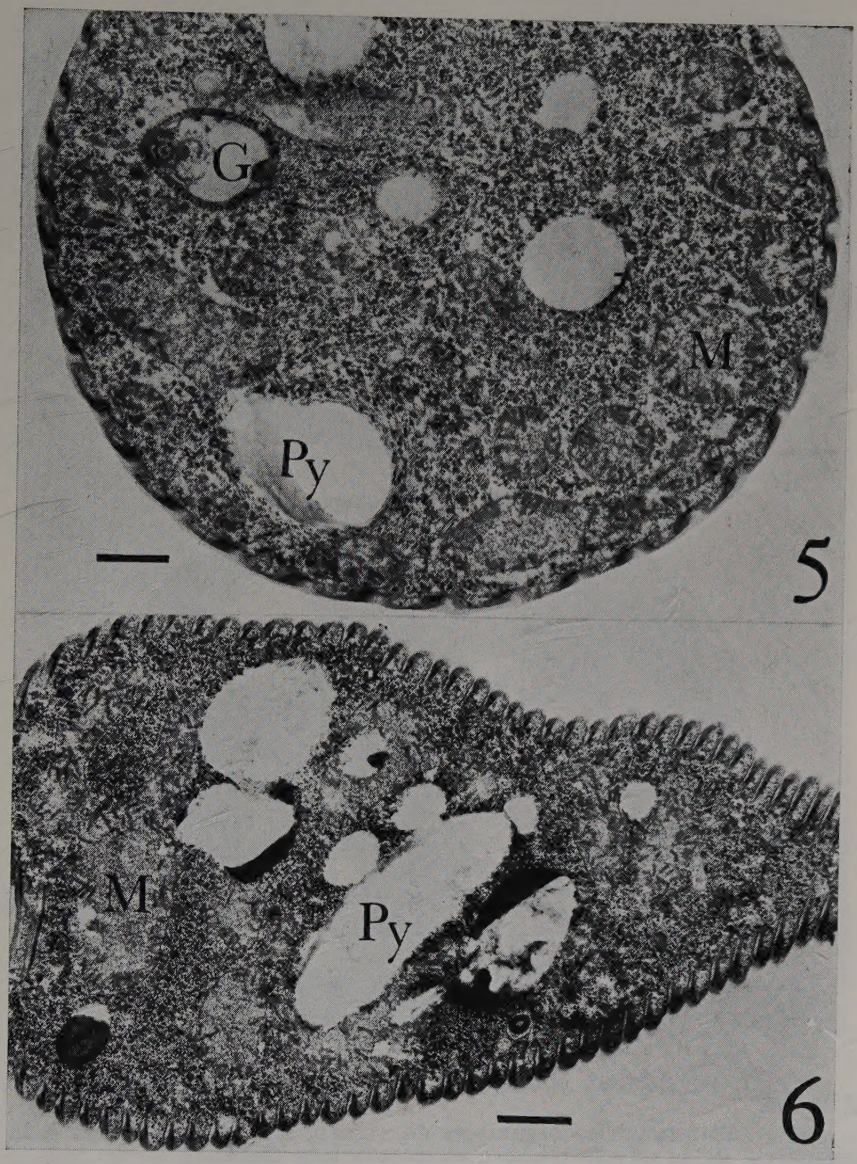

Fig. 5. — Section transversale d'euglène 2 h. environ après la division cellulaire présentant des mitochondries gonflées : M. X 13.500.
G = Goulet.
Py = Paramylon.

Fig. 6. — Section corticale d'euglène 3 à 4 h. après la division cellulaire, X 12.500
M = Mitochondries gonflées qui s'anastomosent et commencent à former un réseau.
Py = Paramylon.

Fig. 7. — Section oblique d'euglène en phase de non division, X 13.500.

M = Mitochondries organisées en réseau, situées en général à la périphérie de la cellule — la matrice est très dense.

Fig. 8. — Section transversale d'euglène en phase de non division, X 13.500.

M = réseau mitochondrial.

G = Goulet.

Py = Paramylon.

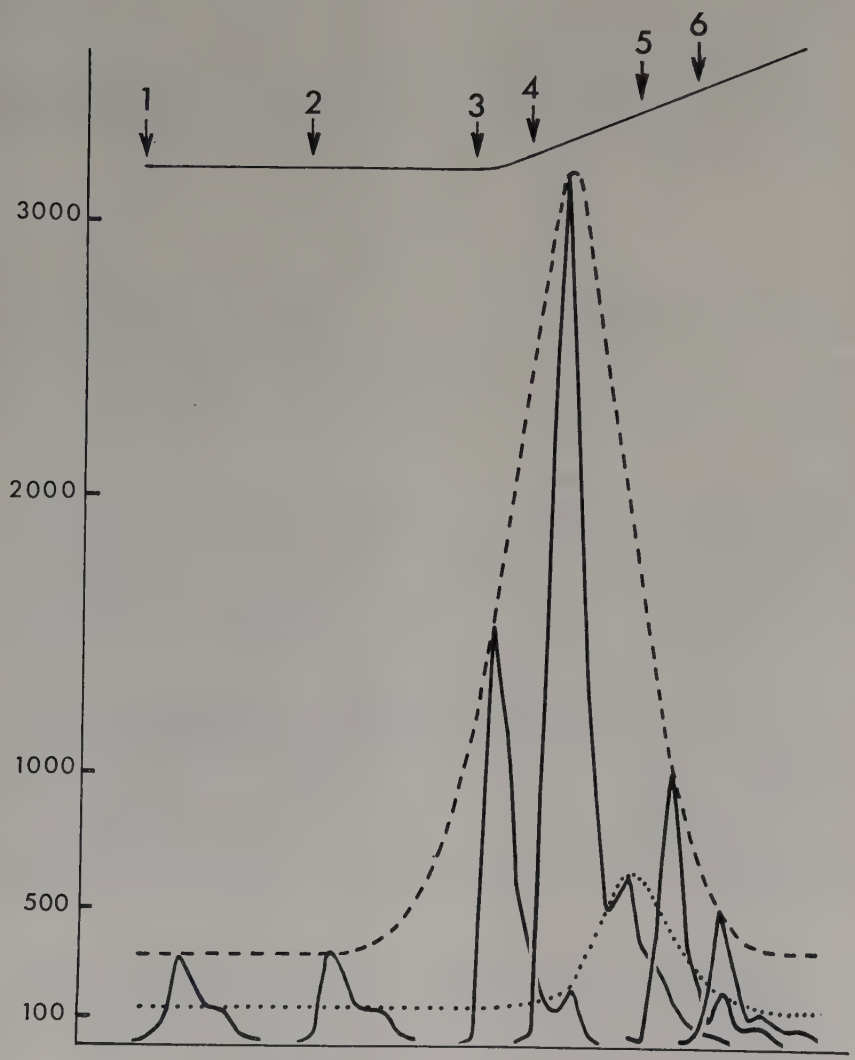

Fig. 9. — Courbe représentant la replication des ADN nucléaire et mitochondrial au cours d'une génération d'euglènes en culture synchrone. La replication est mesurée par l'incorporation d'adénine tritiée.

en ordonnée : Nombre de désintégrations par 2 minutes.

en abscisse : a — pour les courbes en trait plein, l'abscisse représente le n° des fractions prélevées contenant les bandes d'ADN sur gradient de Clcs (gradient recueilli en 40 fractions en moyenne) pour chaque prélèvement effectué dans la culture synchrone.

b — pour les courbes en tiretés (reliant les pics d'ADN nucléaire)

et en pointillé (intégrant les pics d'ADN mitochondrial), l'abscisse représente le temps en heures.

Il est indiqué sur ce graphique le schéma de la courbe de croissance au cours d'une génération de 12 heures. Les numéros et les flèches représentent les différents moments d'incorporation de l'adénine ^{3}H pour une même quantité d'euglènes de la culture synchrone.

CONCLUSION

D'après nos résultats et ceux de la littérature, la croissance et la physiologie de l'euglène paraissent moins sensibles au pH qu'à la nature des substrats carbonés. On peut distinguer parmi ceux-ci deux catégories. Dans la première on trouve les intermédiaires du cycle de Krebs et le glucose qui ne stimulent pas l'intensité respiratoire, dans la seconde des composés tels que l'éthanol, l'acétate, le lactate qui exaltent la respiration de 2 à 3 fois au-dessus de son niveau endogène.

Le lactate paraît jouer un rôle privilégié dans la nutrition de l'euglène ajouté au milieu de culture à raison de 33 mM. Il permet d'atteindre en fin de croissance exponentielle une densité cellulaire de 2 à 2,5 10^{6} cellules/ml. En outre, ce substrat permet de synchroniser les euglènes sur un cycle de 12 heures. Puisque nous avons démontré que cette synchronisation est indépendante du facteur lumière, le lactate joue probablement un rôle primordial qui affecte non seulement la synchronie des divisions de l'euglène mais aussi celle des organites cellulaires.

Si, sur lactate on observe des mitochrondies de grande taille comme celles qui ont été remarquées sur milieu supplémenté en acétate (Lefort, 1964), nous avons pu démontrer que le gigantisme mitochondrial n'est en fait qu'une étape dans une série de modifications morphologiques cycliques, qui affectent le chondriome au cours des générations cellulaires.

En effet, l'étude de la replication des ADN nucléaire et mitochondrial montre qu'elle a lieu juste avant la division cellulaire, qu'elle est discontinue et synchrone pour les deux types d'ADN au cours du cycle.

Cet article fait partie d'une thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles. Université Paris XI (*1972*). *N° d'enregistrement au C.N.R.S. A.O. 7183.*

BIBLIOGRAPHIE

Belsky, M.-M., 1957. — *Bact. Proc., 123.*

Calvayrac, R., Douce, R., 1970. — *FEBS Letters, 7,* 259-262.

Calvayrac, R., Butow, R.-A., Lefort-Tran, M., 1972. — *Exp. Cell Res. 71,* 422-432.

Clark, L.-C., Jr., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z., 1953. — *J. Appl. Physiol., 6,* 189-193

Cook, J.-R., 1971. — *Exp. Cell Res., 69,* 207-211.

COOK, J.-R., HEINRICH, B., 1965. — *J. Protozool. 12,* 581-584.

COOK, J.-R., JAMES, T.-W., 1960. — *Exp. Cell Res. 21,* 583.

CRAMER, M., MYERS, J.. 1952. — *Arch. Mikrobiol. 17,* 384-402.

DANFORTH, W.-F., 1953. — *Arch. Biochem. 46,* 164-173.

DANFORTH, W.-F., WILSON, B.-W., 1957. — *J. Protozool. 4,* 52-55.

DANFORTH, W.-F., 192. —R. LEWIN, Physiol. and Biochem. of Algae, pp. 99-123, New York, Academic Press, Inc.

DE DEKEN-GRENSON, 1959. — *Exp. Cell. Res. 18,* 185-187.

EDMUNDS, L.-N., Jr., 1964. — *Science, 145,* 266.

GREENBLATT, C.-L., SCHIFF, S.-A., 1959. — *J. Protozoll. 6,* 23-28.

GROSSMAN, L.-I., GOLDRING, E.-S., MARMUR, J.-J., 1969. — *J. Mol. Biol. 46,* 367-376.

HULING, R.-T., 1960. — *Trans. Am. Microscop. Soc. 79,* 384.

HURLBERT, R.-E., RITTENBERG, S.-C., 1962. — *J. Protozool. 9,* 170-182.

HUTNER, S.-H., BACH, M.-K., ROSS, G.-I.-M., 1956. — *J. Protozool 3,* 101-102.

HUTNER. S.-M., PROVASOLI, L., 1951. — A. LWOFF, The Biochem. and Physiol. of Protozoa V.1, pp. 27-128, New York Academic Presse.

HUTNER, S.-M., PROVASOLI, L., 1955. — A. LWOFF, The Biochem. and Physiol. of Protozoa V.2, pp. 17-43, New York Academic Press Inc.

LEFORT, *M.*, 1964. — *C.R. Acad. Sci.* (Paris), *258,* 4318-4321.

MITCHELL, J.-L.A., 1971. — *Planta, 100,* 244-257.

PADILLA, G.-M., JAMES, T.-W., 1960. — *Exp. Cell. Res. 20,* 401.

POGO, A.-O., ARCE, A.. 1964. — *Exp. Cell Res. 36,* 390-397.

PRINGSHEIM, E.-G., 1955. — *Arch. Michrobiol. 21,* 414-419

WILSON, B.-W., DANFORTH, W.-F., 1958. — *J. Gen. Microbiol. 18,* 535-542.

(*Laboratoire de Cytophysiologie de la photosynthèse, C.N.R.S.* - 91 - *Gif-sur-Yvette.*)

DISCUSSION

Q. — Mlle GUÉRIN-DUMARTRAIT : « Lorsque les cultures synchrones d'Euglènes sont faites à la lumière, donnez-vous du CO_2 aux cultures ? »

R. — M. CALVAYRAC : « Il n'est pas nécessaire de donner du CO_2 aux cultures en présence de lumière, car les euglènes sont cultivées sur milieu lactate, donc en hétérotrophie. La synchronisation des cellules dans ce cas est assurée par le milieu lui-même; il est superflu d'ajouter du CO_2. »

Imprimerie du
"TÉLÉGRAMME"
Place Wilson
— Brest —